

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

EP 0 579 685

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

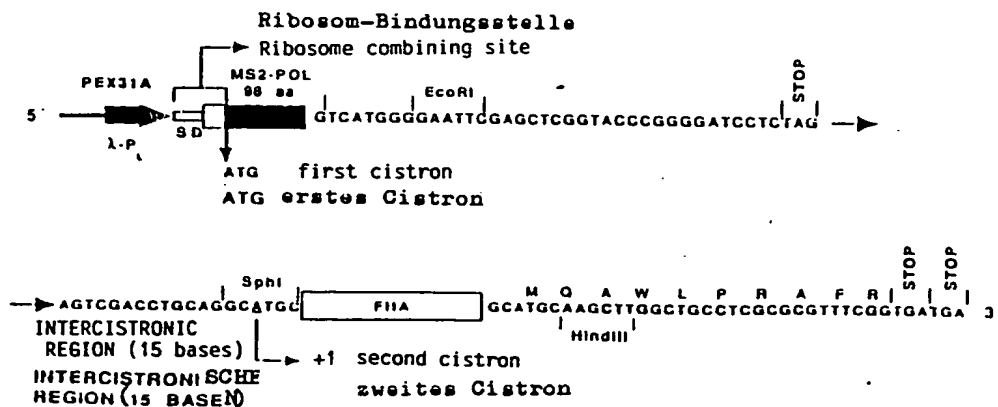
(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 15/00, 15/67, 15/73 C12N 1/21 // (C12N 1/21 C12R 1:19, 1:42)	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/18624 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1992 (29.10.92)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/00814 (22) Internationales Anmeldedatum: 9. April 1992 (09.04.92) (30) Prioritätsdaten: P 41 11 531.7 9. April 1991 (09.04.91) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GE- SELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FOR- SCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : TIMMIS, Kenneth [GB/ DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). GUZMAN, Carlos [AR/IT]; Viale Benedetto XV, 10, I- 16132 Genova (IT). WALKER, Mark [AU/AU]; P.O. Box 1144, Wollongong, NSW 2500 (AU).	(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw. : Bereiteranger 15, D- 8000 München 90 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (euro- päisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (euro- päisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (euro- päisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (euro- päisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäi- sches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (euro- päisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäi- sches Patent), US. Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	

(54) Title: PLASMIDES FOR THE EXPRESSION OF FILAMENTOUS HAEMAGGLUTININ (FHA) AND HOSTS THEREFOR

(54) Bezeichnung: PLASMIDE ZUR FHA-EXPRESSION UND WIRTE

Expression of B-pertussis-FHA in E. coli
Two-cistron System

Expression von B.-pertussis-FHA in E. coli
Zwei-Cistron-System



(57) Abstract

Plasmides for the highly effective expression of unfused filamentous haemagglutinin from Bordetella pertussis for use in the manufacture of acellular and oral live vaccines against whooping cough, and hosts for these plasmides.

(57) Zusammenfassung

Plasmide zur hochwirksamen Expression von unfusioniertem filamentösem Haemagglutinin aus Bordetella pertussis für die Herstellung von azellulären und oralen Lebend-Impfstoffen gegen Keuchhusten sowie Wirte für diese Plasmide.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

Plasmide zur FHA-Expression und Wirte

Plasmide zur hochwirksamen Expression von unfusioniertem filamentösem Haemagglutinin aus *Bordetella pertussis* für die Herstellung von azellularen und oralen Lebend-Impfstoffen gegen Keuchhusten sowie Wirte für diese Plasmide

Bordetella pertussis ist für die Entstehung von Keuchhusten verantwortlich, eine Erkrankung der Atemwege vor allem bei Kindern, die bei stärkster Ausbildung zu ernststen Komplikationen und zum Tode führen kann. Obgleich Gesamtzellimpfstoffzubereitungen, die routinemäßig in Kombination mit Diphtherie- und Tetanustoxoiden verabreicht werden, einen guten Schutz gegen eine ernsthafte Erkrankung bieten, macht man sich zunehmend Sorgen um die Nebenwirkungen der Impfstoffe, was dazu geführt hat, daß die Anzahl der geimpften Kinder abgenommen hat und dementsprechend Keuchhusten zunimmt.

Bordetella pertussis liefert eine Anzahl von virulenten Faktoren, deren Synthese positiv durch die Produkte des *bvg*-Locus (1) reguliert wird, zu denen Pertussis-Toxin, Adenylat-Cyclase, filamentöses Haemagglutinin (FHA), Fimbriae und Hauptproteine der Außenmembran gehören (2). Einige dieser Determinanten sind potentielle Antigene zur Einfügung in eine neue Generation azellulärer, atoxischer, nicht-reaktogenischer Impfstoffe. Eine der erfolgversprechendsten Komponenten für einen derartigen Impfstoff ist FHA, das eine Hauptrolle bei der Anlagerung von Bakterien und der nachfolgenden Besiedlung des epithelialen Atemtrakts während der frühen Erkrankungsstadien spielt. Ferner kann FHA die Superinfektionen begünstigen, die üblicherweise die

- 2 -

Erkrankung erschweren, da sich andere Bakterien dieses brückenbildenden Adhesins (3) bedienen können und da die Makroplasmaantwort als Folge spezifischer Wechselwirkungen beeinträchtigt werden kann, die durch FHA vermittelt werden (4).

Bei der Herstellung von FHA für acelluläre Impfstoffe sind die Fermentierung von *B. pertussis*, einem humanen pathologischen Erreger (Probleme der sicheren Herstellung) und heiklen Mikroorganismus (erfordert ein teures Medium mit langsamen Wachstumsraten (lange Fermentationszeiten, geringe Ausbeuten), und die Verunreinigung von FHA-Präparationen mit anderen Krankheitsfaktoren problematisch, die zu einigen Nebenwirkungen beitragen können, die beim Impfen beobachtet worden sind. Es sind rekombinante Hybridproteine gebildet worden, die FHA-Sequenzen enthalten (5 und 6), obgleich Hybridproteine, die Antigene umfassen, die in keiner Beziehung zur spezifischen Immunantwort stehen, im allgemeinen als für Impfungszwecke unerwünscht angesehen werden.

Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird ein Plasmid zur Expression von FHA in *Escherichia coli* oder *Salmonella* (insbesondere *Salmonella typhimurium*) vorgesehen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es sich um ein Plasmid zur Expression von Strukturgenen handelt und das Plasmid

- einen DNA-Bereich umfaßt, der FHA kodiert, und ferner
- ein oder mehrere Kodons dieses DNA-Bereichs an den Hauptkodongebrauch (Major Codon Usage) bei *E. coli* angepaßt sind.

Insbesondere können ein oder mehrere Kodons, die den N-terminalen FHA-Bereich repräsentieren, angepaßt sein.

- 3 -

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein Plasmid zur Expression von FHA in *Escherichia coli* oder *Salmonella* (insbesondere *Salmonella typhimurium*) vorgesehen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es sich um ein Plasmid zur Expression von Strukturgenen handelt und das Plasmid

- einen DNA-Bereich umfaßt, der FHA kodiert, und ferner
- der N-terminale FHA-Bereich durch den DNA-Unterbereich gemäß Fig. 2D oder den folgenden DNA-Unterbereich repräsentiert wird:

M	N	T	N	L	T	R	L	V	F	S	H	V	R
<u>ATGAACACCAACCTTTATAGACTTGTATTTCTCATGTCCGA</u>													
<u>TACTTGTGGTTGGAAATATCTGAACATAAAAGAGTACAGCT</u>													

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird erfindungsgemäß ein Expressionsplasmid (bzw. rekombinantes Plasmid) zur Expression von FHA in *Escherichia coli* oder *Salmonella* (insbesondere *Salmonella typhimurium*) vorgesehen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es sich um ein Plasmid zur Expression von Strukturgenen handelt, und das Plasmid

- einen DNA-Bereich, der FHA kodiert, sowie
- in Leserichtung vor diesem DNA-Bereich zwei Cistrons derart umfaßt, daß das Ribosom am Startkodon dieses DNA-Bereichs (erneut) mit Translation beginnt.

Ein erfindungsgemäßes Plasmid zur Expression von FHA in *Escherichia coli* oder *Salmonella* (insbesondere *Salmonella typhimurium*) kann in Leserichtung die folgenden Merkmale vorsehen:

- 4 -

- Promotor,
- Shine-Dalgarno-Sequenz,
- Erstes Cistron, beginnend mit einem Startkodon und endend mit einem Stopkodon,
- Intercistronischer Bereich,
- Zweites Cistron, beginnend mit oder bestehend aus einem Startkodon,
- DNA-Bereich, der FHA kodiert, und
- mindestens ein Stopkodon.

Ein DNA-Bereich, der FHA (Wildtyp-FHA) kodiert, liegt in pRMB2 vor. Unter DNA-Bereich werden im vorliegenden Zusammenhang ferner DNA-Sequenzen verstanden, die gleichfalls Wildtyp-FHA kodieren, jedoch von dem in pRMB2 vorliegenden DNA-Bereich abweichen.

Bei dem erfindungsgemäßen Plasmid kann dem DNA-Bereich, der FHA kodiert, der bvg-Locus von *B. pertussis* fehlen.

Das erfindungsgemäße Plasmid kann unter Verwendung eines pEX-Vektors konstruierbar sein, beispielsweise des Vektors pEX31A.

Das erfindungsgemäße Plasmid kann durch den Lambda-Promotor (P_L) und/oder durch die Shine-Dalgarno-Sequenz der Polymerase des Bakteriophagen MS2 gekennzeichnet sein.

Bei dem erfindungsgemäßen Plasmid kann das erste Cistron zwischen dem Start- und dem Stopkodon die Sequenz oder eine Teilsequenz der Polymerase des Bakteriophagen MS2 aufweisen.

Das erfindungsgemäße Plasmid kann durch einen intercistronischen Bereich von 1 bis 50, insbesondere 1 bis 10 und beispielsweise etwa 5 Kodons gekennzeichnet sein.

Bei dem erfindungsgemäßen Plasmid kann das zweite Cistron etwa 3 bis 10 Basen umfassen.

- 5 -

Bei dem erfindungsgemäßen Plasmid kann das mindestens eine Stopkodon von dem DNA-Bereich, der FHA kodiert, unmittelbar folgen oder durch einen Spacer mit etwa 5 bis 100, insbesondere etwa 10 bis 50 Basen getrennt sein.

Bei allen diesen Plasmiden kann der DNA-Bereich, der FHA kodiert, an den Hauptkodongebrauch bei *E. coli* angepaßt sein, insbesondere hinsichtlich ein oder mehrerer Kodons, die den N-terminalen FHA-Bereich repräsentieren, beispielsweise gemäß Fig. 2D oder gemäß der folgenden Sequenz:

M	N	T	N	L	T	R	L	V	F	S	H	V	R
<u>ATGAACACCAACCTTTATAGACTTGTATTTCTCATGTCCGA</u>													
<u>TACTTGTGGTTGGAAATATCTGAACATAAAAGAGTACAGCT</u>													

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein Plasmid zur Expression von FHA in *Escherichia coli* oder *Salmonella* (insbesondere *Salmonella typhimurium*) vorgesehen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es sich um ein Plasmid zur Expression von Strukturgenen handelt, das

- den *atpE*-Translationsstartbereich von *Escherichia coli* und
- einen DNA-Bereich umfaßt, der FHA kodiert.

Diesem DNA-Bereich, der FHA kodiert, kann der *bvg*-Locus von *B. pertussis* fehlen.

Das erfindungsgemäße Plasmid kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es aus pJLA 503 konstruiert worden ist.

Bei dem erfindungsgemäßen Plasmid kann in Leserichtung hinter dem *atpE*-Translationsstartbereich von *E. coli* ein Linker vorgesehen sein, in den der DNA-Bereich eingefügt ist oder auf den der DNA-Bereich folgt, der FHA kodiert.

Dabei kann es sich um den Linker von Figur 2 B handeln. Auch kann bei dem erfindungsgemäßen Plasmid vor dem DNA-Bereich, der

- 6 -

FHA kodiert, ein Linker gemäß Figur 2 B und hinter diesem DNA-Bereich ein Linker gemäß Figur 2 E vorgesehen sein.

Das erfindungsgemäße Plasmid kann ferner dadurch gekennzeichnet sein, daß bei dem DNA-Bereich, der FHA kodiert, derjenige Unterbereich, der N-terminal die erste bis maximal die fünfzehnte Aminosäure kodiert, gegenüber dem FHA-Wildtyp modifiziert ist, ohne die Aminosäuresequenz des Wildtyps abzuändern.

Wiederum kann bei allen diesen Plasmiden der DNA-Bereich, der FHA kodiert, an den Hauptkodongebrauch bei E. coli angepaßt sein, insbesondere hinsichtlich ein oder mehrerer Kodons, die den N-terminalen FHA-Bereich repräsentieren, beispielsweise gemäß Fig. 2D oder gemäß der folgenden Sequenz:

M	N	T	N	L	T	R	L	V	F	S	H	V	R
<u>ATGAACACCAACCTTTATAGACTTGTATTTTCTCATGTCCGA</u>													
<u>TACTTGTGGTTTGGAAATATCTGAACATAAAAAGAGTACAGGCT</u>													

Erfindungsgemäß wird eine effiziente und direkte Expression von nicht-fusioniertem FHA in *Escherichia coli* vorgesehen. Die biologische Abtrennung von FHA von anderen virulenten B.-pertussis-Determinanten, die dadurch erreicht wird, bietet eine Lösung hinsichtlich des Problems, daß FHA-Präparationen mit anderen virulenten *Bordetella*-Determinanten verunreinigt sind. Die Expression von FHA in *E. coli* löst auch die Schwierigkeiten, die mit dem Fermentieren großer Mengen des heiklen langsam wachsenden humanen Erregers verbunden sind.

Ferner wird erfindungsgemäß die Expression von FHA in *Salmonella typhimurium* aro A erreicht. Die Konstruktion eines Lebend-Impfstoffträgerstamms dieser *Salmonella* Subspecies, die B.-pertussis-Antigene exprimiert, kann dazu führen, orale Impfstoffe gegen Keuchhusten vorzusehen, die sowohl eine mukosale als auch eine systemische Immunität stimulieren. Damit öffnen sich neue Perspektiven für die Entwicklung sowohl von Untereinheit-Impfstoffen als auch von Gesamt-Impfstoffen und für die Verwendung gereinigter Antigene bei der Entwicklung von Kits für serodiagnostische oder epidemiologische Studien über Keuchhusten.

Gemäß weiteren Ausführungsformen der Erfindung werden *E. coli* und *Salmonella*, beispielsweise *Salmonella typhimurium*, als Wirt für ein erfindungsgemäßes Plasmid vorgesehen.

Nachstehend wird die Erfindung anhand experimenteller Daten und Figuren näher erläutert. Es zeigen:

Figur 1 die Herstellung von FHA in einem Zwei-Cistron-System;

Figur 2 die Konstruktion eines Plasmids für die direkte Expression von FHA;

Figur 3 die direkte Expression von FHA in *E. coli* und in *Salmonella typhimurium* aro A.

Das Cosmid pRMB2 (7) enthält die genetische Information, die die ersten 3277 Aminosäuren des fhaB-Gens kodiert (5, 6). Eine Kom-

- 2 -

plementierung dieses Gens mit dem bvg-locus, der positiv die FHA-Expression in *B. pertussis* reguliert, führt nicht zu seiner Expression in *E. coli*. Es wurden zwei verschiedene Strategien angewandt, um eine effiziente Expression von FHA in *E. coli* zu erreichen.

Zwei-Cistron-Sytem

Üblicherweise bedient man sich der pEX31-Plasmid-Klonierreihe (8), um Genfusionen mit den ersten 98 Aminosäureresten des NH₂-Terminus des Replikaseproteins des Bakteriophagen MS2 zu erreichen, dessen Expression durch den Lambda-P_L-Promotor kontrolliert wird. Es werden FHA Genfusionen in pCG17 (Aminosäuren 882 bis 1670), pCG22 (Aminosäuren 1670 bis 3241) und pCG24 (Aminosäuren 2028-3241) gebildet. Diese Genfusionen werden benutzt, um die Region darzustellen, die das Epitop (Aminosäuren 1670 bis 2028) enthält, das von dem monoklonalem Antikörper P12H3 (9) erkannt wird, das benutzt wird, um eine FHA-Expression zu ermitteln. Es wird ein Zwei-Cistron-System zur FHA-Produktion verwendet, das nicht mit der MS2-Polymerase fusioniert ist, um sich in vorteilhafter Weise des effizienten Lambda-P_L-Promotors und der hohen ribosomalen Translationsinitiationsrate der MS2-Polymerase Shine-Dalgarno-Sequenz zu bedienen. Beim Klon pCG16 wird das 8,4 kb SphI-SphI-DNA-Fragment, das die Aminosäuren 16 bis 2853 kodiert, in Leserichtung hinter dem TAG-Stopkodon kloniert, das an der XbaI-Stelle der Mehrfachklonierstelle (multiple cloning site) des Vektors pUC18NotI vorliegt. Dieses Stopkodon liegt im Leserahmen mit der MS2-Sequenz von pEX31A. Die intercistronische Region hat eine Länge von 15 Nukleotiden; nach translationaler Termination am TAG-Stopkodon überträgt das Ribosom unmittelbar zum ATG-Startkodon innerhalb der SphdI-Stelle des FHA-Fragments; die Translation des zweiten Cistrons beginnt. Danach wird die Translation an dem doppeltem Stopkodon (TGA-TGA) abgebrochen; das im Plasmid vorliegt; vgl. Figur 1.

- 9 -

Direkte Expression von FHA

Der Expressionsvektor pJLA503 (10), der die hitze- bzw. wärmeregulierten Tandempromotoren P_R und P_L sowie die hocheffiziente *E.-coli-atpE*-Translationsstartregion umfaßt, wird modifiziert, um zusätzliche Restriktionsstellen vorzusehen, um das Subklonieren des FHA-Gens und die Positionierung der im Leserahmen liegenden Stopkodons für die Beendigung der Translation zu ermöglichen. Dieses neue Expressionsplasmid wird pJLACG1 genannt. Man modifiziert die ersten 15 Aminosäuren des *fhaB*-Gens durch linkergerichtete Mutagenesen, um die zu erwartende RNA-Sekundärstruktur um die Ribosombindungsstelle abzubauen, jedoch die Aminosäuresequenz des zu exprimierenden Produktes zu sichern; vgl. Fig. 2.

Man transformiert die Expressionsplasmide pCG18 (Aminosäuren 16 bis 2853), pCG32 (Aminosäuren 1 bis 2853) und pCG26 (Aminosäuren 1 bis 3277) in *E. coli* CAG629 (von Dr. C. Gross), *E. coli* EC538 (von Dr. J. McCarthy) und *E. coli* EC876 (von Dr. R. Brownlie) und in *S. typhimurium* aro A SL3261 (11). Nach Induktion bei 42 °C werden die gesamten Zelleextrakte einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen; man prüft die Anwesenheit von rekombinantem FHA nach dem Western-Blot-Test; vgl. Fig. 3. Eine maximale Expression von FHA in *E. coli* wird mit EC538 pCG26 erreicht. Dieses Konstrukt exprimiert auch hohe Niveaus von FHA in *S. typhimurium* aro A. Das Plasmid pCG26 exprimiert ein nicht-fusioniertes rekombinantes Protein mit einem ungefähren Molekulargewicht von 220 kD. Dieses Protein deckt die kodierenden Sequenzen von FHA ab, die zur Expression aller Epitope erforderlich sind, die bei der Immunantwort gegen Wildtyp-FHA erkannt werden.

Experimentelle Daten in Verbindung mit Figur 1:

FHA-Produktion in einem Zwei-Cistron-System.

- (A) Der Bereich, der das Epitop kodiert, das von dem monoklonalen Antikörper P12H3 (von Dr. C. Parker) erkannt wird, ist durch den schwarzen Balken dargestellt. Schattierte Balken entsprechen der fhaB-Gen-Sequenz, die durch pCG22, pCG24 und pCG17 in Form von Fusionsproteinen oder im Zwei-Cistron-System (pCG16) kodiert wird. Das Pluszeichen und das Minuszeichen repräsentieren die Anwesenheit bzw. Abwesenheit einer Reaktion auf die Proteine, die durch Klone mit dem monoklonalen Antikörper P12H3 oder ein polyklonales Anti-FHA-Antiserum in Western-Blot-Tests anfallen.
- (B) SDS-PAGE von Gesamtzellextrakten, die mit Coomassie-Blue angefärbt worden sind. Streifen 1: Molekulargewichts-Standards; Streifen 2 bis 6: E. coli 537(pCI 857^{TS}) mit einem Gehalt an pCG24, pCG22, pCG17, pCG16 bzw. pEX31A; Pfeile weisen auf die Hauptfusionsproteine hin.
- (C) Western-Blot-Analysen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers P12H3. Streifen 1: Molekulargewichts-Marker; Streifen 2: gereinigtes FHA von B. pertussis (Tohama-Stamm); Streifen 3 bis 7: E. coli 537 (pCI857^{TS}) mit einem Gehalt an pEX31A (Streifen 3), pCG22 (Streifen 4 und 5), pCG16 (Streifen 5 und 6). Für die Streifen 4 und 6 wurde 30 min. lang induziert, während bei den Streifen 3, 5 und 7 2 h lang induziert wurde.
- (D) Western-Blot-Analysen unter Verwendung von polyklonalem Antiserum gegen FHA. Streifen 1: Molekulargewichts-Standards; Streifen 2: gereinigtes FHA von B. pertussis; Streifen 3 bis 11: E. coli 537(pCI857^{TS}) mit einem Gehalt an pCG24 (Streifen 3 und 7), pCG22 (Streifen 4 und 8), pCG17 (Streifen 5 und 9), pCG16 (Streifen 6 und 10), pEX31A

- 11 -

(Streifen 11). Bei den Streifen 3 bis 6 wurde 30 min. lang induziert, während bei den Streifen 7 bis 11 2 h lang induziert wurde. Molekulargewichts-Standards (Größen in kD) sind durch Pfeile bezeichnet.

(E) Graphische Darstellung des Zwei-Cistron-Systems im Klon pCG16.

Experimentelle Daten in Verbindung mit Figur 2: Konstruktion von Plasmiden für die direkte Expression von FHA.

- (A) Expressionsplasmid pJLACG1, das die *Lamda*-Promotoren P_R und P_L in Tandem-Anordnung (schwarze Pfeile), den *atpE*-Translationsinitiations-Bereich (schwarze Strecken), den FD-Transscriptions-Terminator, das β -Lactamase-Gen und die *NdeI*/*SalI*-Mehrfachklonierstelle (MCS) umfaßt.
- (B) *SphI*/*SalI*-Linker, der zum Modifizieren der Mehrfachklonier-Stelle von pJLA503 verwendet wurde, um pJLACG1 zu konstruieren und ein Subklonieren verschiedener DNA-Fragmente für eine Klonierung von FHA im Expressionsplasmid zu ermöglichen.

(C) und (D)

Ursprüngliche Kodierregion (C) und modifizierte Kodierregion (D) des *NdeI*/*SphI*-Linkers. Die Nukleotidsequenz des N-terminalen FHA-Bereichs ist in der Ein-Buchstaben-Schreibweise wiedergegeben. Die *NdeI*-Restriktionsstelle (CATATG) und die *SphI*-Restriktionsstelle (GCATGC) sind näher bezeichnet. Basenpaar-Veränderungen, die Unterschieden zwischen der ursprünglichen Nukleotidsequenz und dem synthetischen Oligonukleotid-Linker *NdeI*/*SphI* entsprechen, sind durch kleine Pfeile bezeichnet, wobei die großen Pfeile einen Teil des *atpE*-Translationsinitiations-Bereichs fortführen, der vom

- 12 -

Expressionsplasmid pJLA503 kodiert wird. Ferner ist die RNA-Stabilität +/- 50 Basen vom ATG-Startkodon aus angegeben.

(E) SphI/EcoRI-Linker für pCG32.

Experimentelle Daten in Verbindung mit Figur 3: Direkte Expression von FHA in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* aro A.

- (A) Graphische Darstellung der Klone pCG26, pCG18 und pCG32 zur Expression von FHA. Die Anwesenheit oder Abwesenheit des NdeI/SphI-Linkers ist durch schwarze Balken gegeben. Schattierte Balken entsprechen der fhaB-Gensequenz, die durch pCG26, pCG18 und pCG32 kodiert wird. Das Niveau der FHA-Expression, das durch Western-Blot-Analysen mit dem monoklonalen Antikörper P12H3 bestimmt wurde, reicht von geringem Niveau (+/-) bis zu intensivem Niveau (+++).
- (B) Gesamtzellextrakte von Klonen, die Western-Blot-Analysen unterworfen wurden. Streifen 1: Molekulargewichts-Standards; Streifen 2: Gereinigtes FHA; Streifen 3: *B. pertussis* (Stamm Tohama); Streifen 4 bis 7: *E. coli* CAG629 mit einem Gehalt an pJLACG1, pCG18, pCG32 und pCG26; Streifen 8 bis 10: *E. coli* 876 mit einem Gehalt an pCG18, pCG32 und pCG26; Streifen 11 bis 13, *E. coli* EC538 mit einem Gehalt an pCG18, pCG32 und pCG26; Streifen 14 bis 17: *Salmonella typhimurium* aro A SL3261 mit einem Gehalt an pJLACG1, pCG18, pCG26 und pCG32.

Lebendmaterial etc.

Literatur oder Quelle

E. coli 537(pCI857^{TS})

CAG 629

EC 538

EC 876

S. typhimurium aro A SL 3261

11

B. pertussis (Tohama-Stamm)

MS2

Lambda Pl

p CG 16

DSM 6 439

p CG 17

DSM 6 440

p CG 18

DSM 6 441

p CG 22

DSM 6 442

p CG 24

DSM 6 435

p CG 26

DSM 6 436

p CG 32

DSM 6 437

p EX 31

8

p EX 31A

p JLA 503

10: Medac (Hamburg)

p JLA CG 1

DSM 6 438

p UC 18 Not I

p RMB 2

7; DSM 6 443

P 12 H3

9

MS2-Polymerase

REFERENCES

- 1) Knapp S., and J.J. Mekalanos. 1988. Two trans-acting regulatory genes (vir and mod) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. J.Bacteriol. 170:5059-5066.
- 2) Robinson A., and L.A.E. Ashworth. 1988. Acellular and defined component vaccines against pertussis, in A.C.Wardlaw, and R. Parton (eds), Pathogenesis and Immunity in Pertussis. John Wiley and Sons, Chichester. pp 399-417.
- 3) Tuomanen E. 1986. Piracy of adhesins: attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of *Bordetella pertussis*. Infect.Immun. 54:905-908.
- 4) Relman D., E.Tuomanen, S.Falkow, D.T.Golenbock, K. Saukkonen, S.D.Wright. 1990. Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: macrophage CR3 (MB2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. Cell 61:1375-1382.
- 5) Domenighini M., D.Relman, C.Capiau, S.Falkow, A.Prugnola, V.Scarlato, R.Rappuoli. 1990. Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. Mol.Microbiol. 4:787-800.
- 6) Relman D.A., M.Domenighini, E.Tuomanen, R.Rappuoli, S.Falkow. 1989. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 86:2637-2641.

- 7) Brownlie R.M., J.G. Coote, R.Parton, J.E.Schultz, A.Rogel, E.Hanski. 1988. Cloning of the adenylate cyclase genetic determinant of *Bordetella pertussis* and its expression in *Escherichia coli* and *B.pertussis*. Microb.Path. 4:335-344.
- 8) Strebel K., E. Beck, K. Strohmaier, H. Schaller. 1986. Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. J.Virol. 57:983-991.
- 9) Frank D.W., C.D.Parker. 1984. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to *Bordetella pertussis*. J.Biol.Stand. 12:353-365.
- 10) Schauder B., H. Blöcker, R. Frank, and J.E.G. McCarthy. 1987. Inducible expression vectors incorporating the *E.coli atpE* translational initiation region. Gene. 52:279-283.
- 11) Hoiseth S.K., and B.A.D. Stocker. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. Nature. 291:238-239.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Plasmid zur Expression von FHA in *Escherichia coli* oder *Salmonella* (insbesondere *Salmonella typhimurium*), dadurch **gekennzeichnet**, daß es sich um ein Plasmid zur Expression von Strukturgenen handelt und das Plasmid

- einen DNA-Bereich umfaßt, der FHA kodiert, und ferner
- ein oder mehrere Kodons dieses DNA-Bereichs an den Hauptkodon-gebrauch (Major Codon Usage) bei *E. coli* angepaßt sind.

2. Plasmid nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß ein oder mehrere Kodons, die den N-terminalen FHA-Bereich repräsentieren, angepaßt sind.

3. Plasmid zur Expression von FHA in *Escherichia coli* oder *Salmonella* (insbesondere *Salmonella typhimurium*), dadurch **gekennzeichnet**, daß es sich um ein Plasmid zur Expression von Strukturgenen handelt und das Plasmid

- einen DNA-Bereich umfaßt, der FHA kodiert, und ferner
- den N-terminalen FHA-Bereich durch den DNA-Unterbereich gemäß Fig. 2D oder den folgenden DNA-Unterbereich repräsentiert wird:

M	N	T	N	L	T	R	L	V	F	S	H	V	R
<u>ATGAACACCAACCTTTATAGACTTGTATTTTCTCATGTCCGA</u>													
<u>TACTTGTGGTTGGAAATATCTGAACATAAAAGAGTACAGGC</u>													

- 17 -

4. Plasmid zur Expression von FHA in *Escherichia coli* oder *Salmonella* (insbesondere *Salmonella typhimurium*), dadurch **gekennzeichnet**, daß es sich um ein Plasmid zur Expression von Strukturgenen handelt und das Plasmid

- einen DNA-Bereich, der FHA kodiert, sowie
- in Leserichtung vor diesem DNA-Bereich zwei Cistrons derart umfaßt, daß das Ribosom am Startkodon dieses DNA-Bereichs (erneut) mit Translation beginnt.

5. Plasmid zur Expression von FHA in *Escherichia coli* oder *Salmonella* (insbesondere *Salmonella typhimurium*) mit den folgenden Merkmalen in Leserichtung:

- Promotor,
- Shine-Dalgarno-Sequenz,
- Erstes Cistron, beginnend mit einem Startkodon und endend mit einem Stopkodon,
- Intercistronischer Bereich,
- Zweites Cistron, beginnend mit oder bestehend aus einem Stopkodon,
- DNA-Bereich, der FHA kodiert, und
- mindestens ein Stopkodon.

6. Plasmid nach Anspruch 4 oder 5, dadurch **gekennzeichnet**, daß dem DNA-Bereich, der FHA kodiert, der *ovg*-Locus von *S. pertussis* fehlt.

7. Plasmid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, konstruierbar unter Verwendung eines pEX-Vektors, beispielsweise des Vektors pEX31A.

8. Plasmid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet** durch den Lambda-Promotor (P_L).

9. Plasmid nach einem der vornergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet** durch die Shine-Dalgarno-Sequenz der Polymerase des Bakterioophagen MS2.
10. Plasmid nach einem der vornergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß das erste Cistron zwischen dem Start- und dem Stopkodon die Sequenz oder eine Teilsequenz der Polymerase des Bakterioophagen MS2 aufweist.
11. Plasmid nach einem der vornergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet** durch einen intercistronischen Bereich von 1 bis 50, insbesondere 1 bis 10 und beispielsweise etwa 5 Kodons.
12. Plasmid nach einem der vornergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß das zweite Cistron etwa 3 bis 10 Basen umfaßt.
13. Plasmid nach einem der vornergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß das mindestens eine Stopkodon dem DNA-Bereich, der FHA kodiert, unmittelbar folgt oder durch einen Spacer mit etwa 5 bis 100, insbesondere etwa 10 bis 50 Basen getrennt ist.
14. Plasmid nach einem der vornergehenden Ansprüche, zusätzlich **gekennzeichnet** durch die Merkmale gemäß Anspruch 1, 2 oder 3.
15. *Escherichia coli*, umfassend ein Plasmid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.
16. *Salmonella*, beispielsweise *Salmonella typhimurium*, umfassend ein Plasmid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.
17. Plasmid zur Expression von FHA in *Escherichia coli* oder *Salmonella* (insbesondere *Salmonella typhimurium*), dadurch **gekennzeichnet**, daß es sich um ein Plasmid zur Expression von Strukturgenen handelt, das
- den *atpE*-Translationsstartbereich von *Escherichia coli* und
 - einen DNA-Bereich umfaßt, der FHA kodiert.

- 19 -

18. Plasmid nach Anspruch 17, dadurch *gekennzeichnet*, daß dem DNA-Bereich, der FHA kodiert, der *ovg*-Locus von *B. pertussis* fehlt.

19. Plasmid nach Anspruch 7 oder 8, dadurch *gekennzeichnet*, daß er aus pJLA 503 konstruiert worden ist.

20. Plasmid nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch *gekennzeichnet*, daß in Leserichtung hinter dem *atpE*-Translationsstartbereich von *E. coli* ein Linker vorgesehen ist, in den der DNA-Bereich eingefügt ist oder auf den der DNA-Bereich folgt, der FHA kodiert.

21. Plasmid nach Anspruch 20, *gekennzeichnet* durch den Linker von Figur 2 B.

22. Plasmid nach Anspruch 20, dadurch *gekennzeichnet*, daß in Leserichtung vor dem DNA-Bereich, der FHA kodiert, ein Linker gemäß Figur 2 B und hinter dem DNA-Bereich ein Linker gemäß Figur 2 E vorgesehen ist.

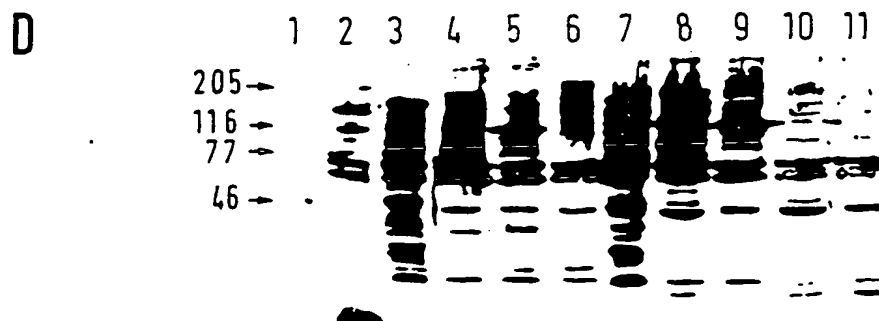
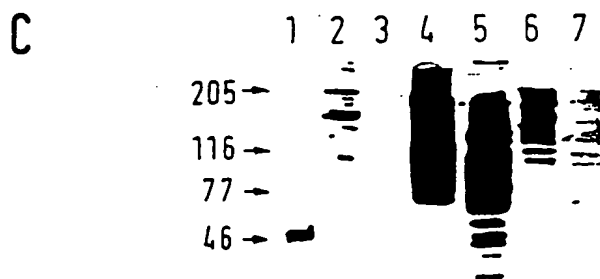
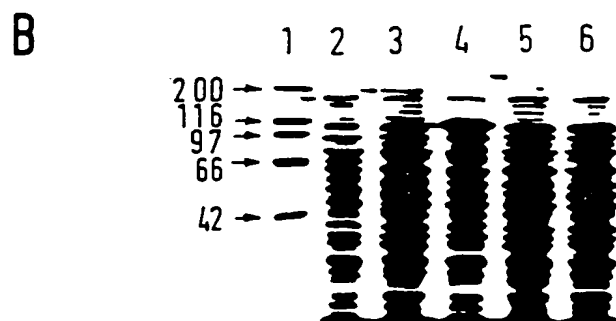
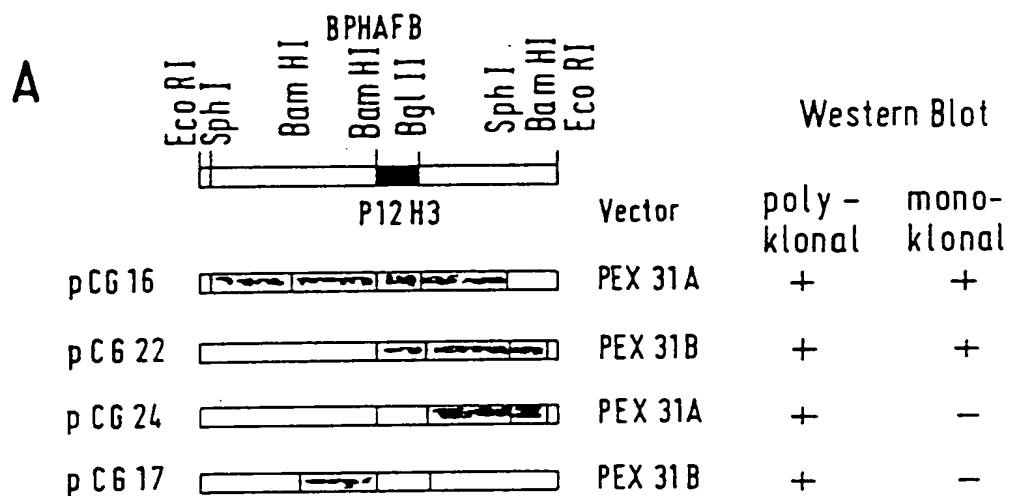
23. Plasmid nach einem der Ansprüche 17 bis 22, dadurch *gekennzeichnet*, daß bei dem DNA-Bereich, der FHA kodiert, derjenige Unterbereich, der N-terminal die erste bis maximal die fünfzehnte Aminosäure kodiert, gegenüber dem FHA-Wildtyp modifiziert ist, ohne die Aminosäuresequenz des Wildtyps abzuändern.

24. Plasmid nach Anspruch 23, zusätzlich *gekennzeichnet* durch die Merkmale gemäß Anspruch 1, 2 oder 3.

25. *E. coli*, umfassend ein Plasmid gemäß einem der Ansprüche 17 bis 24.

26. *Salmonella*, beispielsweise *Salmonella typhimurium*, umfassend ein Plasmid gemäß einem der Ansprüche 17 bis 24.

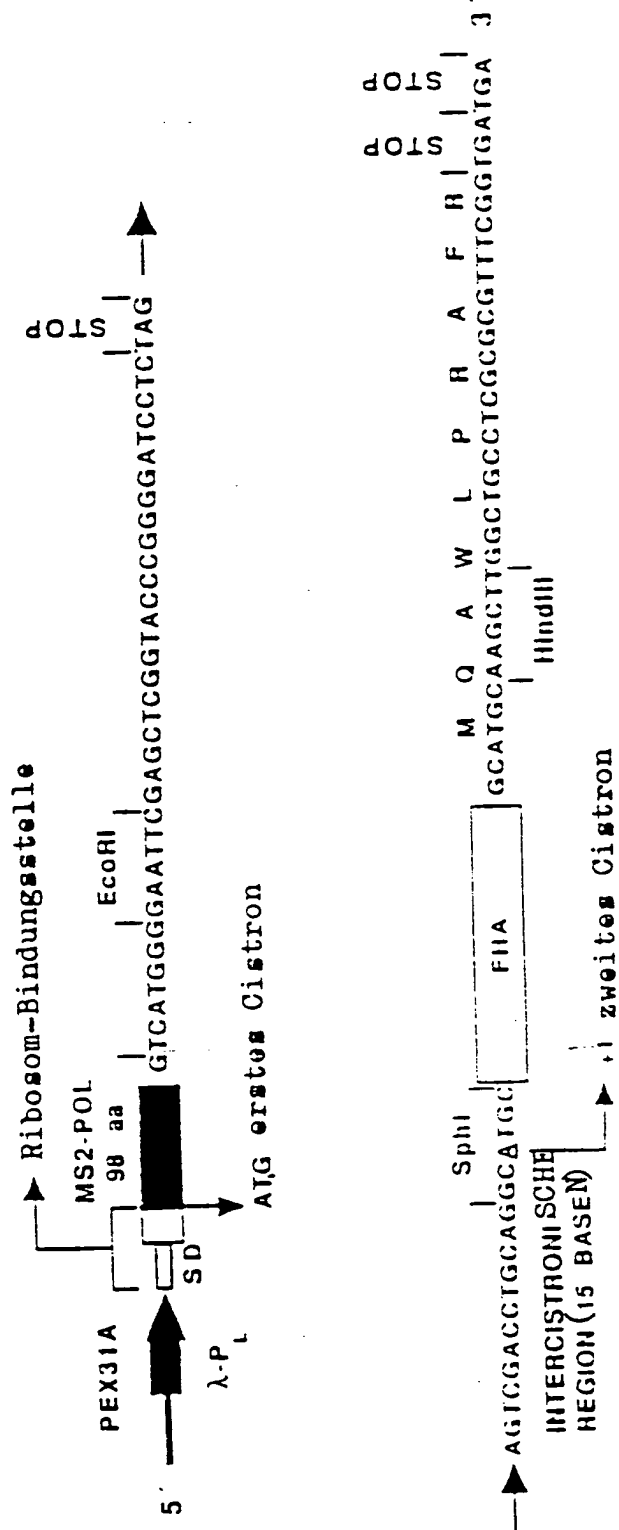
1/6
Fig.1



2/6

Figur 1 (Blatt 2)

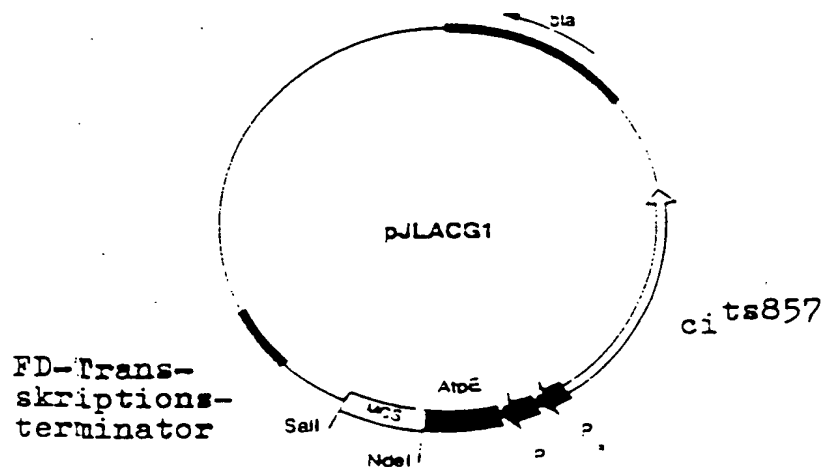
E
Expression von B.-pertussis-FHA in E. coli
Zwei-Cistron-System



3/6

Figur 2 (Blatt 1)

A



4/6

B

RNA-Stabilität

C

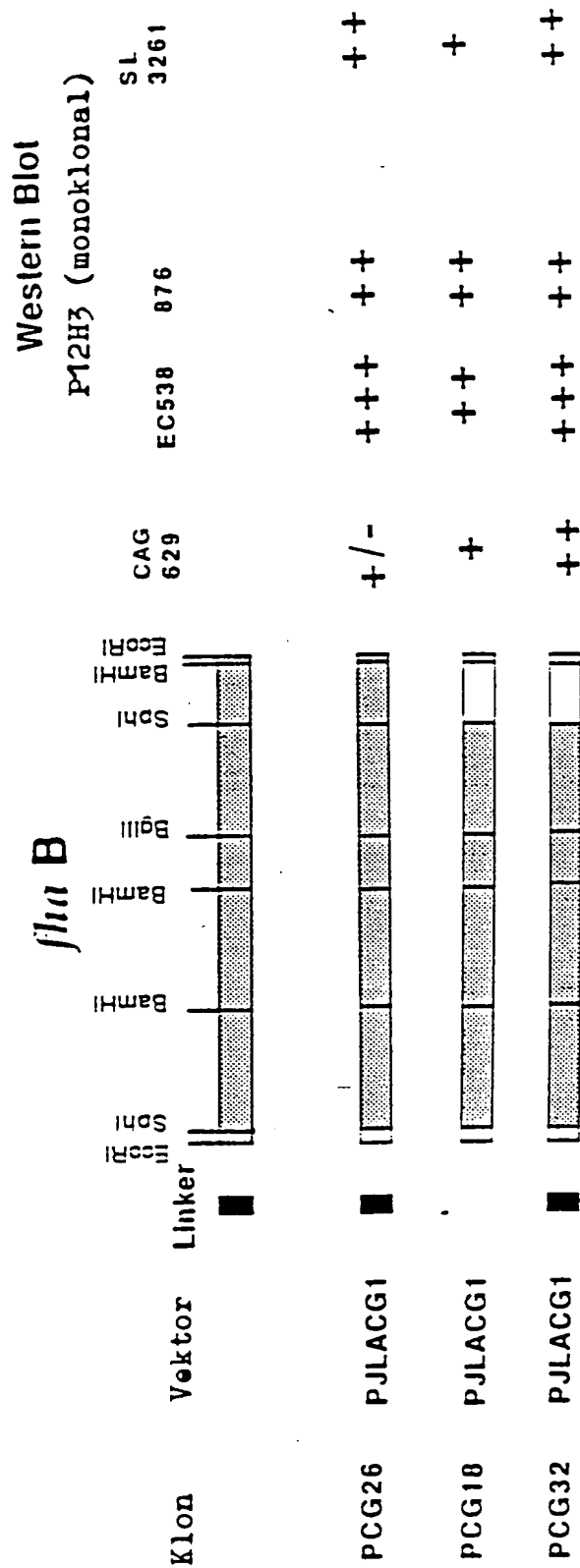
D

E

SphI / EcoRI-Linker Stop Stop
 SphI XbaI BamHI EcoRI
 5' GCATCTCTAGAGGATCCTGAATTCATAATAA 3'
 3' CTACGAGATCTCTAGGACTTAAGTATTAT 5'
 Stop

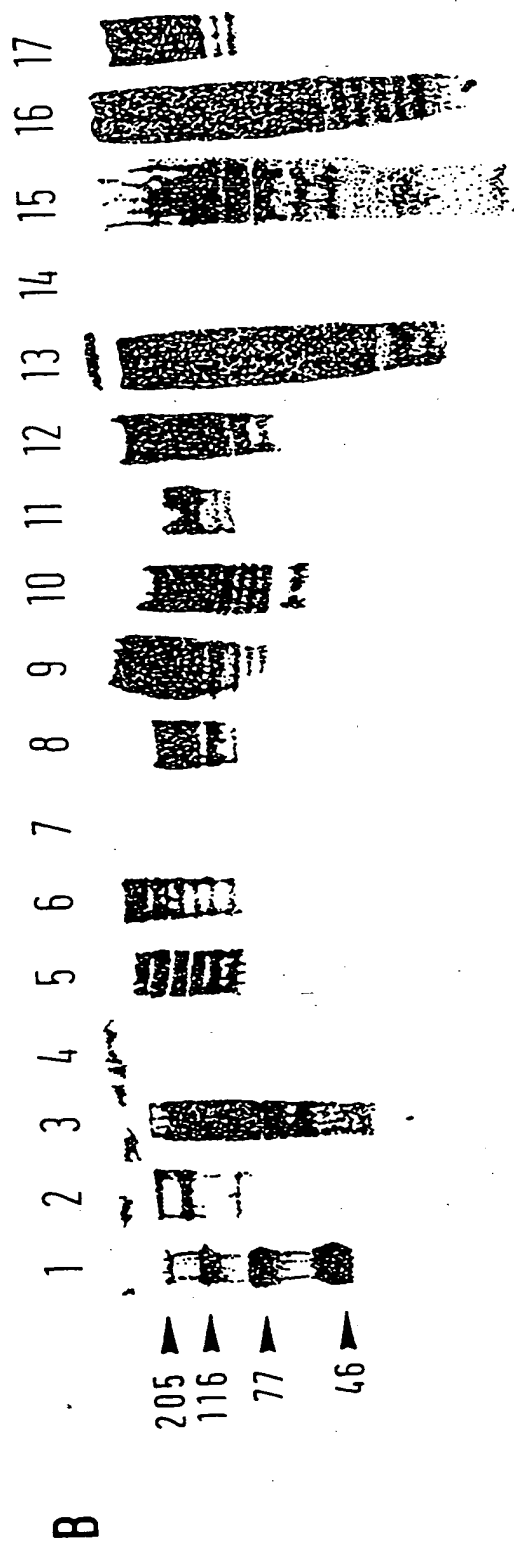
Figur 3 (Blatt 1)

A



6/6

Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/00814

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁵ C12N15/00; C12N15/67; C12N15/73; C12N1/21
 (((12N1/21;C12R1;19,1:42))
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ C07K ; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,9004641 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 03 May 1990	1-8,10, 11,17, 18,20
Y	GENE Vol.52,1987,ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; pages 279 - 283; B.SCHAUDER ET AL.: "Inducible expression vectors incorporating the Escherichia coli atpE translation region" cited in the application	17,18,20
Y	GENE Vol.58,1987,ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y.,U.S.; pages 77 - 86; N. LEE ET AL.: "Modification of mRNA secondary structure and alteration of the expression of human interferon alphas in Escherichia coli"	1-3 ./...

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 July 1992 (10.07.92)

Date of mailing of the international search report

29 July 1992 (29.07.92)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/00814

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PROC.NATL.ACAD SCI. Vol.83, No.22, November 1986, NATL.ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US; pages 8506 - 8510; B.E. SCHONER ET AL.: "Translation of a synthetic two-cistron mRNA in Escherichia coli" ---	4-8, 10, 11
P, X	INFECTION AND IMMUNITY Vol.59, No.10, October 1991, AM. SOC. MICROBIOL., BALTIMORE, US; pages 3787 - 3795; C.A. GUZMAN ET AL.: "Direct expression of Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin in Escherichia coli and Salmonella typhimurium aroA" -----	1-26

EP 9200814
SA 58915

TYPE FORM F-101

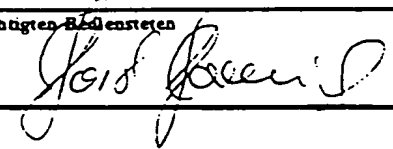
11

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 92/00814

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 5 C12N15/00; C12N15/67; C12N15/73; C12N1/21 /(C12N1/21; C12R1: 19, 1: 42)		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C07K ; C12N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
Y	WO, A, 9 004 641 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 3. Mai 1990 ---	1-8, 10, 11, 17, 18, 20
Y	GENE Bd. 52, 1987, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; Seiten 279 - 283; B. SCHAUDER ET AL.: 'Inducible expression vectors incorporating the Escherichia coli atpE translation region' in der Anmeldung erwähnt ---	17, 18, 20
Y	GENE Bd. 58, 1987, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; Seiten 77 - 86; N. LEE ET AL.: 'Modification of mRNA secondary structure and alteration of the expression of human interferon alpha1 in Escherichia coli' ---	1-3
<p>¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>---</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
10. JULI 1992		29.07.92
Internationale Recherchenbehörde EUROPAISCHES PATENTAMT		Unterschrift des bevollmächtigten Beamten HORNIG H. 

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>PROC. NATL. ACAD SCI. Bd. 83, Nr. 22, November 1986, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US; Seiten 8506 - 8510; B.E. SCHONER ET AL.: 'Translation of a synthetic two-cistron mRNA in Escherichia coli'</p> <p>---</p>	4-8, 10, 11
P, X	<p>INFECTION AND IMMUNITY Bd. 59, Nr. 10, Oktober 1991, AM. SOC. MICROBIOL., BALTIMORE, US; Seiten 3787 - 3795; C.A. GUZMAN ET AL.: 'Direct expression of Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin in Escherichia coli and Salmonella typhimurium aroA'</p> <p>---</p>	1-26

EP 9200814
SA 58915

Patentdokumente angeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

EPO FORM 007J

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

THIS PAGE BLANK (USPTO)